



VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Takayuki Hirose, registered Japanese Patent Attorney, having my business place at c/o Hirose International Patent Firm, Chester Court Nihonbashi 1204, 1-13, Nihonbashi Koami-cho, Chuo-ku, Tokyo 103-0016 Japan, do hereby declare that I am conversant in the Japanese and the English language and that I am the translator of the documents attached and certify that to the best of my knowledge and belief the following is a true and correct English translation of the priority document of PCT/JP2004/004190, Japanese Patent Application No.2003-085666.

Signature :

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Takayuki Hirose", written over a horizontal line.

Takayuki Hirose

This

11 day of July, 2007



Tokugan 2003-085666

PAGE:

1/

[Document Name] Japanese Patent Application
[Reference Number] P03-0030
[Filing Date] March 26, 2003 (Heisei 15)
[Destination] Commissioner of Patent Office
[International Patent Classification] A61K 38/17
[Inventor]
[Address] c/o PHARMADESIGN, INC., Dai-2 Goseki Bldg.,
4-2-10, Hatchobori, Chuo-ku, Tokyo 104-0032
JAPAN
[Name] Hara, Takane
[Inventor]
[Address] c/o Cellular Biophysics Class, Department of
Physiology, Nagoya University Graduate School of
Medicine, 65, Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya-shi,
Aichi 466-0065 JAPAN
[Name] Sokabe, Masahiro
[Inventor]
[Address] c/o PHARMADESIGN, INC., Dai-2 Goseki Bldg.,
4-2-10, Hatchobori, Chuo-ku, Tokyo 104-0032
JAPAN
[Name] Furuya, Toshio
[Applicant]
[ID Number] 500386563
[Name] PHARMADESIGN, INC.
[Attorney]
[ID Number] 100092783
[Name] Hiroshi Kobayashi
[Telephone Number] 03-3273-2611
[Attorney]
[ID Number] 100095360
[Name] Eiji Katayama
[Attorney]
[ID Number] 100093676
[Name] Sumiko Kobayashi
[Attorney]
[ID Number] 100116850

[Name]	Takayuki Hirose	
[Indication of Fee]		
[Pre-payment Registration Number]	157061	
[Paid Amount]	21000	
[List of Filed Materials]		
[Material]	Specification	1
[Material]	Drawings	1
[Material]	Abstract	1
[Number of General Power of Attorney]	0201166	
[Proof]	Need	



[Name of Document] Specification

[Title of Invention] LOW-MOLCULAR WEIGHT PEPTIDES INHIBITING ION CHANNEL ACTIVITY

[Claims]

[Claim 1] A polypeptide or salts thereof consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3.

[Claim 2] A polypeptide or salts thereof comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3.

[Claim 3] A polypeptide or salts thereof consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 of which one or more of the amino acids thereof has been deleted, substituted, inserted or added, but not consisting of an amino acid sequence described in SEQ ID NO:4 and moreover showing mechano-sensitive channel inhibiting activity.

[Claim 4] A polynucleotide comprising the polynucleotide that encodes the polypeptide described in claim 1.

[Claim 5] A recombinant vector comprising the polynucleotide described in claim 4.

[Claim 6] A transformant transformed with the recombinant vector described in claim 5.

[Claim 7] A mechano-sensitive channel inhibitor comprising one or more of the polypeptides or salts thereof described in one of the claims from claim 1 to claim 3.

[Claim 8] A remedy of atrial fibrillation comprising one or more of the polypeptides or salts thereof described in one of the claims from claim 1 to claim 3.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]

The present invention relates to a polypeptide that inhibits the activity of a mechano-sensitive channel, and relates to a mechano-sensitive channel inhibitor and remedy for atrial fibrillation comprising the polypeptide. More specifically, the present invention determines the pharmacophore that acts upon the mechano-sensitive channel based on the sequence of a natural peptide from spider venom (GsMTx-4), and it relates to novel polypeptides designed to compose the pharmacophore which are moreover useful for atrial fibrillation treatment.

[0002]

[Background of Art]

Atrial fibrillation is a type of arrhythmia, of which the morbidity prevalence rate increases with advanced age. Atrial fibrillation is a heart disease observed in 3 % of the elderly (over 65 years old). When atrial fibrillation becomes chronic, it

forms a thrombosis and induces cerebral thrombosis, and therefore it is currently thought that atrial fibrillation is the main disease factor of serious cases of cerebral apoplexy. Thus, considering the frequency and seriousness of complications such as cerebral infarction, atrial fibrillation has come to be regarded in recent years as one kind of lethal arrhythmia (J. Nippon. Med. Sch. 2002, 69(3)). Heretofore, a remedy that completely cures atrial fibrillation had not been obtained, and so it had been assumed that medication for atrial fibrillation, particularly chronic atrial fibrillation, had its limits (J. Nippon. Med. Sch. 2002, 69(3)).

[0003]

Atrial fibrillation is believed to be caused in part by the malfunctioning of an ion channel in the myocardium. Meanwhile, a natural peptide from spider venom (GsMTx-4: SEQ ID NO:4) is known to inhibit the activity of a mechano-sensitive channel (Stretch-Activated Channel: SAC) (see for example Thomas M. Suchyna et al., Identification of a Peptide Toxin from Grammostola Spatulata Spider Venom that Blocks Cation-selective Stretch-activated Channels, J. Gen. Physiol., Vol. 115, pp583-598 (2000) (non-patent document 1)). In the said document, it is described that in peptides composing toxins derived from venoms from terrestrial and aquatic animals, an ICK (Inhibitor Cysteine Knot) motif with six cysteines is commonly observed (non-patent document 1, p.590, right column, ll.7 to 3 from bottom, and fig.30). The said document also suggests that GsMTx-4 has an ICK (Inhibitor Cysteine Knot) consensus cysteine motif with a basic structure defined by three cysteine pairs (C₁-C₄, C₂-C₅ and C₃-C₆) (non-patent document 1, p.595, left column, 1.7 to 1.11 from bottom, column 'The structure of GsMTx-4').

[0004]

Furthermore, methods for extracting and purifying GsMTx-4, methods for treating cerebral arrhythmia with the said GsMTx-4 and so forth have been suggested (see for example Bode et al., Nature, Vol.409, pp35-36 (2001) (non-patent document 2), US Patent Application Published Description No.2002/0077286 (patent document 1)). Further, the structure of GsMTx-4 has been known from results obtained in a solution using NMR (see Robert et al., J. Biol. Chem. Vol.37, pp3443-3445, 2002. (non-patent document 3)). Despite such findings, a remedy for atrial fibrillation using the peptide derived from spider venom (GsMTx-4) had not been developed.

[0005]

[Patent document 1]

US Patent Application Published Description No.2002/0077286;

[Non-patent document 1]

Thomas M. Suchyna et.al., Identification of a Peptide Toxin from Grammostola Spatulata Spider Venom that Blocks Cation-selective Stretch-activated Channels, J. Gen. Physiol., Vol.115, pp583-598 (2000);

[Non-patent document 2]

Bode et al., Nature, Vol.409, pp35-36 (2001);

[Non-patent document 3]

Robert et al., J. Biol. Chem. Vol.37, pp3443-3445 (2002).

[0006]

[Problem to be Solved by Invention]

The object of the present invention is to identify the pharmacophore (the minimum space structure needed for activation) of GsMTx-4, to design novel polypeptides that specifically inhibit the activity of a mechano-sensitive channel based on the pharmacophore information, and to provide remedies for atrial fibrillation comprising such polypeptides.

[0007]

[Means for Solving Problem]

The above objects are achieved by the following inventions.

- (1) In a first aspect of the present invention, it involves a polypeptide or salts thereof consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3. These polypeptides, as confirmed in the embodiment of this description, are polypeptides that show mechano-sensitive channel inhibiting activity, and can be considered as polypeptides that compose the pharmacophore of GsMTx-4. These polypeptides are useful for treatment of atrial fibrillation and such.
- (2) In a second aspect of the present invention, it involves a polypeptide or salts thereof comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3.
- (3) In a third aspect of the present invention, it involves a polypeptide or salts thereof consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO:3 of which one or more of the amino acids thereof have been deleted, substituted, inserted or added, but not comprising an amino acid sequence described in SEQ ID NO:4, and moreover showing mechano-sensitive channel inhibiting activity.
- (4) In a fourth aspect of the present invention, it involves a polynucleotide comprising a polynucleotide that encodes the polypeptide described in the above (1).
- (5) In a fifth aspect of the present invention, it involves a recombinant vector comprising the polynucleotide described in the above (4).

(6) In a sixth aspect of the present invention, it involves a transformant transformed by the recombinant vector described in the above (5).

(7) In a seventh aspect of the present invention, it involves a mechano-sensitive channel inhibitor comprising one or more of the polypeptides or salts thereof described in one of the above (1) to (3). This inhibitor specifically inhibits the activity of a mechano-sensitive channel and thus is useful for conducting researches on mechano-sensitive channels and such.

(8) In an eighth aspect of the present invention, it involves a remedy for atrial fibrillation comprising one or more of the polypeptides or salts thereof described in one of the above (1) to (3). These polypeptides, as confirmed of their functions in the embodiment of this description, show mechano-sensitive channel inhibiting activity. Therefore, this remedy can be used effectively in treating atrial fibrillation.

[0008]

[Embodiment for Carrying Out the Invention]

(Polypeptides of the present invention)

The Polypeptides of the present invention consist of a polypeptide consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3; a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3; a polypeptide consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 of which one or more of the amino acids have been deleted, substituted, inserted or added, but not comprising an amino acid sequence described in SEQ ID NO:4, and moreover showing mechano-sensitive channel inhibiting activity (namely, the polypeptides involved in embodiments 1 to 3 of the present invention).

[0009]

Furthermore, the polypeptides of the present invention may have a C-terminus in the form of a carboxyl group (-COOH), a carboxylate (-COO⁻), an amide (-CONH₂), an ester (-COOR) or the like.

The polypeptides of the present invention include polypeptides wherein the amino group at the methionine residue of the N-terminus is protected with a protecting group. The polypeptides of the present invention include polypeptides wherein the N-terminal is cleaved in vivo and the Gln thus formed is pyroglutaminated. The polypeptides of the present invention include polypeptides wherein a substituent on a side chain is protected by an appropriate protecting group. The polypeptides of the present invention include synthetic polypeptides such as the so-called glycoproteins having conjugated sugar chains.

[0010]

The salts of the polypeptides of the present invention may be salts in the form of physiologically acceptable salts with acids or bases, preferably in the form of physiologically acceptable acid addition salts. Examples of such salts include salts with inorganic acids (e.g. hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid), and salts with organic acids (e.g. acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methanesulfonic acid, benzensulfonic acid).

[0011]

(Composition of the polypeptides of the present invention)

The polypeptides of the present invention may be prepared by chemical synthesis, or may be manufactured using recombinant DNA technology. To prepare the polypeptides of the present invention by chemical synthesis, the publicly known methods may be used, for example, the peptide of the present invention can be obtained by methods using azide, acid chloride, acid anhydride, compound acid anhydride, DCC, activated ester, Woodward's reagent K, carbonylimidazole, deoxidization, DCC/HONB, BOP reagent (see for example Bozanszky, M and M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966); Schroeder and Luebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965); F. M. Finn and K. Hofmann, The Proteins Vol.2, H. Nenrath, R. L. Hill ed., Academic Press Inc., New York (1976); Nobuo Izumiya et al., *Peptide Gosei no Kiso to Jikken* (Basics and experiments of peptide synthesis), Maruzen Co. (1985); Haruaki Yajima and Shunpei Sakakibara et al., *Seikagaku Jikken Koza* (Biochemical Experiment) 1, Japanese Biochemical Society ed., Tokyo Kagaku Dojin Co. (1977); Toshiya Kimura, *Zoku Seikagaku Jikken Koza* (Sequel to Biochemical Experiment) 2, Japanese Biochemical Society ed., Tokyo Kagaku Dojin Co. (1987)). Furthermore, the peptide of the present invention can be prepared by chemical synthesis using an automated peptide synthesizer (e.g. PE Applied Bio Systems Co.).

[0012]

Further, following the completion of reaction, the polypeptides of the present invention can be purified and separated by publicly known purification methods. For example, the polypeptide of the present invention can be purified and separated by a combination of solvent extraction, distillation, column chromatography, liquid chromatography, recrystallization and the like. Where the peptide of the present invention obtained by the above methods is in a free form, publicly known methods can be used to convert it into a salt form, and on the other hand, where the peptide is

obtained in a salt form, publicly known methods can be used to convert it into a free form.

[0013]

(Polynucleotide encoding the polypeptide)

The polynucleotide encoding the polypeptide of the present invention may be any polynucleotide so long as it contains the base sequence (DNA or RNA, preferably DNA) encoding the polypeptide of the present invention. For example, the polynucleotide may be the DNA or RNA such as mRNA encoding the polypeptide of the present invention, and it can either be double stranded or single stranded. When double stranded, it may be a double stranded DNA, a double stranded RNA or a hybrid of DNA and RNA. When single stranded, it may either be a sense strand (namely, a coding strand) or an anti-sense strand (namely, a non-coding strand).

[0014]

Using the polynucleotide encoding the polypeptide of the present invention, mRNA of the polypeptide of the present invention can be assayed, for example, according to the publicly known method described in the special issue of *Jikken Igaku* (Experimental Medicine), *Shin PCR to Sono Oyo* (Novel PCR and its application) 15(7), 1997, or according to a similar method.

The DNA encoding the polypeptide of the present invention include genomic DNA, genomic DNA library, cDNA derived from the cells or tissues described above, cDNA library derived from the cells and tissues described above, and synthetic DNA, of which any one thereof can be employed. Examples of the vector used for the library include bacteriophage, plasmid, cosmid and phagemide, of which any one thereof can be employed. Further, the DNA can be directly amplified by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (hereinafter abbreviated as RT-PCR) employing a total RNA or a mRNA fraction prepared from the cells or tissues described above.

[0015]

For cloning the DNA encoding the polypeptide of the present invention, there is the method of amplifying by PCR using synthetic DNA primers comprising a part of the base sequence of the DNA encoding the polypeptide of the present invention. The cloning of the DNA encoding the polypeptide of the present invention can also be performed by selecting the DNA inserted into an appropriate vector by hybridization with a labeled DNA fragment or synthetic DNA that encodes a part of the region or the entire region of the polypeptide of the present invention. Hybridization can be carried out, for example, according to the method

described in Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989). When using commercially available library, hybridization can be carried out according to the method described in the attached instructions.

[0016]

Substitution of the base sequence of the DNA can be carried out by PCR or by using publicly known kits, for example, MutanTM-super Express Km (Takara Shuzo Co.) and MutanTM-K (Takara Shuzo Co.) according to publicly known methods such as ODA-LA PCR, Gapped duplex method and Kunkel method, or according to similar methods.

The cloned DNA encoding the polypeptides can be used as it is, or if desired, used after digesting with a restriction enzyme or after adding a linker thereto. Such DNA can contain ATG as translation initiation codon at the 5' end thereof and can contain TAA, TGA or TAG as translation termination codon at the 3' end thereof. These translation initiation codon and translation termination codon can be added by using an appropriate synthetic DNA adapter.

The expression vector of the polypeptide of the present invention can be manufactured, for example, by excising a desired DNA fragment from the DNA encoding the polypeptide of the present invention and then ligating the DNA fragment downstream of a promoter in an appropriate expression vector.

[0017]

Examples of the vector include plasmids derived from a *Escherichia coli* (e.g., pCR4, pCR2.1, pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), plasmids derived from *Bacillus subtilis* (e.g., pUB110, pTP5, pC194), plasmids derived from yeast (e.g., pSH19, pSH15), bacteriophages such as λ phage, animal viruses such as retrovirus, vaccinia virus and baculovirus, as well as pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV and pcDNAI/Neo.

[0018]

The promoter employed in the present invention can be any promoter so long as it is an appropriate promoter matching the host used for gene expression. For example, when using animal cells as the host, SR α promoter, SV40 promoter, LTR promoter, CMV promoter, HSV-TK promoter or such can be utilized.

Of these, it is preferable to use CMV promoter, SR α promoter or the like. When using bacteria of the genus *Escherichia* as the host, the preferred promoter is trp promoter, lac promoter, recA promoter, λ P_L promoter, lpp promoter or the like, when using bacteria of the genus *Bacillus* as the host, the preferred promoter is SPO1 promoter, SPO2 promoter, penP promoter or the like, when using yeast as the host, the preferred promoter is PHO5 promoter, PGK promoter, GAP promoter,

ADH promoter or the like. When using insect cells as the host, it is preferable to use polyhedron promoter, P10 promoter or the like.

[0019]

For the expression vector, in addition to the above examples, those comprising an enhancer, a splicing signal, a poly A addition signal, a selection marker, an SV40 replication origin (hereafter may be abbreviated as SV40ori) or such can be used if so desired. Examples of the selection marker include dihydrofolate reductase (hereinafter may be abbreviated as dhfr) gene (methotrexate (MTX) resistance), ampicillin resistant gene (hereinafter may be abbreviated as Amp^r), neomycin resistant gene (hereinafter may be abbreviated as Neo^r, G418 resistance) and the like. In particular, when using dhfr gene as the selection marker by employing CHO (dhfr⁻) cells, the desired gene may be selected using a medium not comprising thymidine.

When necessary, a signal sequence matching the host is added to the N-terminus of the polypeptide of the present invention. When using bacteria of the genus *Escherichia* as the host, PhoA signal sequence, OmpA signal sequence or such can be utilized, when using bacteria of the genus *Bacillus* as the host, α -amylase signal sequence, subtilisin signal sequence or such can be utilized, when using yeast as the host, MF α signal sequence, SUC2 signal sequence or such can be utilized, and when using animal cells as the host, insulin signal sequence, α -interferon signal sequence, antibody molecule signal sequence or such can be utilized.

[0020]

Using the vector comprising the DNA encoding the polypeptide of the present invention thus composed, transformants can be manufactured.

[0021]

Examples of the host include bacteria of the genus *Escherichia*, bacteria of the genus *Bacillus*, yeast, insect cells, insect and animal cells.

[0022]

Specific examples of the bacteria of the genus *Escherichia* include *Escherichia coli* K12 • DH1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 160 (1968)), JM103 (Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981)), JA221 (Journal of Molecular Biology, 120, 517 (1978)), HB101 (Journal of Molecular Biology, 41, 459 (1969)), C600 (Genetics, 39, 440 (1954)), DH5 α (Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., Gene, 96, 23-28 (1990)), and DH10B (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4645-4649 (1990)).

[0023]

Examples of the bacteria of the genus *Bacillus* include *Bacillus subtilis* MI114 (Gene, 24, 255 (1983)), and 207-21 (Journal of Biochemistry, 95, 87 (1984)).

[0024]

Examples of yeast include *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, *Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913, NCYC2036, and *Pichia pastoris*.

[0025]

For insect cells, where the virus is AcNPV, *Spodoptera frugiperda* cells (Sf cells), MG1 cells derived from the mid-intestine of *Trichoplusia ni*, HighFive™ cells derived from the egg of *Trichoplusia ni*, cells derived from *Mamestra brassicae*, cells derived from *Estigmene acrea* and the like can be used. Where the virus is BmNPV, *Bombyx mori* N cells (BmN cells) and the like can be used. Examples of the Sf cells thereof include Sf9 cells (ATCC CRL1711), and Sf21 cells (see Vaughn, J. L. et al., In Vivo, 13, 213-217 (1977) for above).

[0026]

For insects, the larva of silkworms can be used (Maeda et al., Nature, 315, 592 (1985)).

[0027]

Examples of animal cells include monkey cells COS-7, Vero, Chinese hamster cells CHO (hereinafter abbreviated as CHO cells), dhfr gene deficient Chinese hamster cells CHO (hereinafter abbreviated as CHO(dhfr⁻) cells), mouse L cells, mouse AtT-20, mouse myeloma cells, rat GH3, and human FL cells.

[0028]

Bacteria of the genus *Escherichia* can be transformed according to the method described, for example, in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972) or in Gene, 17 107 (1982).

[0029]

Bacteria of the genus *Bacillus* can be transformed according to the method described, for example, in Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979).

[0030]

Yeast can be transformed according to the method described, for example, in Methods in Enzymology, 194, 182-187 (1991) or in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)

[0031]

Insect cells and insects can be transformed according to the method described, for example, in Bio/Technology, 6, 47-55 (1988)

[0032]

Animal cells can be transformed according to the method described, for example, in Saibo Kogaku (Cell Engineering) extra issue 8, Shin Saibo Kogaku

Jikken Protocol (New Cell Engineering Experimental Protocol), 263-267, Shujunsha (1995) or in Virology, 52, 456 (1973).

[0033]

Thus, a transformant transformed with the expression vector comprising the DNA encoding the polypeptide of the present invention can be obtained.

[0034]

In cultivating the transformant having bacteria of the genus *Escherichia* or bacteria of the genus *Bacillus* as the host, the appropriate medium used for cultivation is a liquid medium wherein carbon sources, nitrogen sources, inorganic substances and such required for the growth of the said transformant are contained. Carbon sources include glucose, dextrin, soluble starch, sucrose and the like, nitrogen sources include inorganic or organic matter such as ammonium salts, nitrate salts, corn steep liquor, peptone, casein, meat extract, soybean cake, potato extract and the like, and inorganic substances include calcium chloride, sodium dihydrogenphosphate, magnesium chloride and the like. In addition, yeast extract, vitamins, growth promoting factors and such can be added. The pH of the medium is preferably about 5 to 8.

[0035]

The preferred medium for cultivating bacteria of the genus *Escherichia* is M9 medium comprising glucose and Casamino acids (Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)) or the like. When necessary, chemicals such as 3 β -indolylacrylic acids can be added therein to make the promoter function efficiently.

[0036]

When using bacteria of the genus *Escherichia* as the host, cultivation is generally carried out at about 15 to 43 °C for about 3 to 24 hours, and aeration or agitation can be conducted when necessary.

[0037]

When using bacteria of the genus *Bacillus* as the host, cultivation is generally carried out at about 30 to 40 °C for about 6 to 24 hours, and aeration or agitation can be conducted when necessary.

[0038]

When cultivating a transformant with yeast as the host, the medium to be used is, for example, Burkholder's minimal medium (Bostian, K. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4505 (1980)), or SD medium comprising 0.5% Casamino acids (Bitter, G. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5330 (1984)). Preferably, pH of the medium is adjusted to about 5 to 8. Cultivation is generally carried out at about

20 to 35 °C for about 24 to 72 hours, and aeration or agitation is conducted when necessary.

[0039]

When cultivating a transformant with insect cells or insects as the host, the medium to be used is, for example, Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., Nature, 195,788 (1962)) to which is added appropriate amounts of additives such as immobilized 10 % calf serum. Preferably, pH of the medium is adjusted to about 6.2 to 6.4. Cultivation is generally carried out at about 27 °C for about 3 to 5 days, and aeration or agitation is conducted when necessary.

[0040]

When cultivating a transformant with animal cells as the host, the medium to be used is, for example, MEM medium comprising about 5 to 20 % of fetal calf serum (Science, 122, 501 (1952)), DMEM medium (Virology, 8, 396 (1959)), RPMI 1640 medium (Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)), or 199 medium (Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)) Preferably, pH should be about 6 to 8. Cultivation is carried out at about 30 to 40 °C for about 15 to 60 hours, and aeration or agitation is conducted when necessary.

[0041]

In the foregoing manner, the polypeptide of the present invention can be produced in the transformant intracellularly, in cell membranes, or extracellularly.

[0042]

The polypeptide of the present invention can be separated and purified from the above culture medium using the methods described below.

When extracting the polypeptide of the present invention from the cultured bacteria or cells, appropriate methods are used in which following cultivation, bacteria or cells are collected by publicly known methods and suspended in an appropriate buffer, the bacteria or cells are then disrupted by ultrasound, lysozyme and/or freeze-thawing, after which the crude extract of the polypeptide is obtained through centrifugation or filtration. The buffer may contain a protein modifier such as urea or guanidine hydrochloride, or a surfactant such as Triton X-100™. Where the polypeptide is secreted into the culture broth, following the completion of cultivation, the bacteria or cells are separated from the supernatant using a publicly known method, and the supernatant is collected.

[0043]

The polypeptide contained in the cultured supernatant or the extract thus obtained can be purified by appropriately combining publicly known separation and purification methods. Such publicly known separation and purification methods

include methods that make use of solubility such as salting out and solvent precipitation, methods that make use of difference in molecular weight such as dialysis, ultrafiltration, gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, methods that make use of difference in electric charge such as ion exchange chromatography; methods that make use of the difference in specific affinity such as affinity chromatography, methods that make use of difference in hydrophobicity such as reverse phase high performance liquid chromatography, and methods that make use of difference in isoelectric point such as isoelectrofusing electrophoresis.

[0044]

Where the polypeptide thus obtained is in a free form, publicly known methods or similar methods can be used to convert it into a salt form, and on the other hand, where it is obtained in a salt form, publicly known methods or similar methods can be used to convert it into a free form or into another salt form.

[0045]

Further, the polypeptide produced by the recombinant can be optionally modified and parts of the polypeptide can be removed by activating an appropriate protein modifying enzyme before or after purification. Examples of the protein-modifying enzyme include trypsin, chymotrypsin, arginyl endopeptidase, protein kinase and glycosidase.

[0046]

The activity of the polypeptide of the present invention or salts thereof thus generated can be measured by a binding experiment to a labeled ligand, an enzyme immunoassay using a specific antibody, or such.

[0047]

(Mechano-sensitive channel inhibitors)

A mechano-sensitive channel inhibitor contains, for example, one or more of either the polypeptides of the present invention or salts thereof (hereinafter may be described as polypeptides of the present invention). The polypeptides of the present invention can be utilized as mechano-sensitive channel inhibitors. The polypeptides of the present invention are easy to handle, and as shown in the embodiments below, display high inhibiting activity.

[0048]

(Remedies for atrial fibrillation)

A remedy for atrial fibrillation contains, for example, one or more of either the polypeptides of the present invention or salts thereof.

The remedy for atrial fibrillation comprising the polypeptide of the present invention can be administered parenterally, for example, into the blood vessel of the

heart in the form of an injection, or can be used orally, for example, in the form of tablets or capsules. Formulations for injection can be provided in ampules comprising a unit dosage or in containers comprising multiple dosages. Moreover, the preparations can be administered not only to humans but also to other warm-blooded animals. The formulations can be prepared using publicly known preparation methods.

[0049]

The various preparations can be manufactured using conventional methods by appropriately selecting generally used formulations such as an excipient, a swelling agent, a binder, a moistening agent, a disrupting agent, a lubricant, a surface-active agent, a dispersing agent, a buffer, a preservative, a solubilizing agent, an antiseptic, a sweetening and flavoring agent, a soothing agent, a stabilizing agent, and an isotonic agent. The various agents described above may also contain pharmaceutically acceptable carriers or additives. Such carriers or additives include water, pharmaceutically acceptable organic solvents, collagen, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, carboxyvinylpolymer, alginate acid sodium, water-soluble dextran, carboxymethyl starch sodium, pectin, Xanthan gum, gum arabic, casein, gelatin, agar, glycerin, propylene glycol, polyethylene glycol, Vaseline, paraffin, stearate alcohol, stearic acid, human serum albumin, mannitol, sorbitol, and lactose. The additives to be used are selected appropriately or in combination from those described above according to the formulations of the present invention.

[0050]

The polypeptide of the present invention consisting of the activated component in the forms described above is contained therein, for example, 0.01 to 100% by weight, preferably 0.1 to 90% by weight, more preferably 1 to 50% by weight.

[0051]

Concerning the dosage of the polypeptide of the present invention, when administered parenterally, the amount of one dosage differs depending on the subject of administration, symptoms and route of administration; and so, if administered in the form of injection to a patient (weighing 60 kg) with atrial fibrillation, for example, the daily dosage is generally about 0.01 to 30 mg, preferably about 0.1 to 20 mg, more preferably about 0.1 to 10 mg. When administered orally to an atrial fibrillation patient (weighing 60 kg), for example, the daily dosage is about 0.1 to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferably about 1.0 to 20 mg. The remedy for atrial fibrillation of the present invention is

preferably administered once to several times a day for a duration of more than one day.

[0052]

(Identification of the pharmacophore)

In designing the polypeptide of the present invention, the region of the peptide from spider venom (GsMTx-4) consisting of the pharmacophore that is the minimal unit necessary for activation has been estimated with good precision based on a three-dimensional structure.

The pharmacophore can be identified for example in the manner described hereinafter. First, a precise structure estimation of the peptide from spider venom is conducted according to the homology modeling method using a similar peptide with a known three-dimensional structure as the template. Based on the structure thus obtained, a function analysis of the peptide with a modified activated part is performed and the target part for pharmaceutical design is narrowed down. A design that mimics the disulfide bond region of GsMTx-4 is created, and the peptide with a stable structure is designed. GsMTx-4 is known to have a three-dimensional structure of relatively low flexibility that comprises three disulfide bonds, and so the pharmacophore needed for activation is identified by designing several cyclic peptides comprising polar amino acid residues generally often involved in the binding process.

[0053]

(Measurement of the activity)

The activity evaluation method of the peptide of the present invention can be carried out using the publicly known activity evaluation method, preferably using the single channel current recording method employing the patch clamp method described in embodiment 1.

[0054]

[Embodiments]

(Embodiment 1)

Example 1: Search for a similar peptide with a known structure showing high homology to the sequence of the peptide from the spider venom (GsMTx-4).

A structure with high homology to the amino acid sequence of GsMTx-4 of SEQ ID NO:4 was searched among the spider venoms from PDB (Protein Data Bank). Consequently, 10 candidates with high homology to GsMTx-4 were found. The results of the multiple alignment of those candidates are shown in Fig. 1 below.

Of the sequences shown in Fig.1, 1QK6 (Huwentoxin-I: SEQ ID NO:12) comprising the same cysteine residues, and moreover having almost the same length

between the cysteine residues with no insertion or deletion (GsMTx-4 is one residue longer) was selected as the template to narrow down the pharmacophore using the homology modeling method.

[0055]

Example 2: Estimation of the three dimensional structure of the peptide of spider venom (GsMTx-4).

Homology modeling was carried out using the template peptide 1QK6. First, alignment of 1QK6 and GsMTx-4 was performed. The result is shown in Fig.2.

[0056]

Next, the model structure was constructed with program MODELLER. The superimposition of the constructed structure model of GsMTx-4 and Huwentoxin-I used as the template is shown in Fig. 3 and in Fig. 4. Fig. 3 is a stereo view of the superimposed Huwentoxin-I and GsMTx-4. Fig. 4 is a Ca trace of the model of the superimposed Huwentoxin-I and GsMTx-4. In Fig. 4, the thin lines indicate the template, and the thick lines indicate GsMTx-4.

[0057]

The vicinity of Arg20 considered to be the activity center of Huwentoxin-I is shown in Fig. 5. In Fig. 5, the thin lines indicate Huwentoxin-I, and the thick lines indicate GsMTx-4. Furthermore, comparisons of the surface structures of Huwentoxin-I and GsMTx-4 are shown in Fig.6. In Figs. 6(a) to 6(d), the left side shows Huwentoxin-I, and the right side shows GsMTx-4. Fig. 6(a) is a view from a hydrophobic patch (approximately the same direction as the drawings above). Fig. 6(b) is a view rotated +90° around the x-axis. Fig. 6(c) is a view rotated +90° around the y-axis. Fig. 6(d) is a view rotated 180° around the y-axis. Fig. 6(b) shows that the molecules of the two peptides have quite different forms. The distributions of the residues with isolable side chains also differ, and can be assumed to be concerned with the determination of specificity.

[0058]

Further, by comparing the structure of GsMTx-4 obtained in a solution using NMR disclosed in Robert et. al., J. Biol. Chem. Vol.37, pp3443-3445, 2002 (non-patent document 3 mentioned above) and the structure of GsMTx-4 obtained in the present embodiment, the modeling structure constructed in the present invention can be judged as reflecting the actual structure of GsMTx-4.

[0059]

Example 3: Design of the active peptide and identification of the pharmacophore thereof

Based on the modeling structure of GsMTx-4 described above, the policy for designing the peptide fragments was decided. The structure of GsMTx-4 and the designed structure of the peptides are shown in Fig. 7. GsMTx-4 comprises four loops formed by three disulfide bonds as indicated in the sequence structure formula shown in Fig.7. Therefore, five peptides TVP001 to TVP005 were designed to determine the loop contributing to the inhibiting activity. In these peptides, cysteines at the regions not composing the loops have been substituted with alanines. TVP001 (SEQ ID NO:14) comprises loops 1 and 2, TVP002 (SEQ ID NO:15) comprises loops 3 and 4, TVP003 (SEQ ID NO:1) comprises loop 2, TVP004 (SEQ ID NO:2) comprises loop 3, and TVP005 (SEQ ID NO:3) comprises loops 2 and 3.

[0060]

(Bioassay of the designed peptides)

Activity assay of the peptides was carried out by the most reliable single channel current recording method using the patch clamp method. As the subject of the assay, Ca^{2+} dependant BigK channel (Kawakubo et. Am J Physiol, 276 : H1827.1999) derived from heart muscle was employed. By applying this channel to the expressed ventricle muscle of chicken or to CHO cells force-expressing the cDNA of this channel with the cell-attached patch clamp method, an inside-out excised patch was formed, and single channel current recordings were taken under a fixed membrane potential. Assuming that the designed synthetic peptide blocks the channel extracellularly the same as GsMTx-4, the space a fixed distance above the glass pipette used for recording was filled with the peptide of a known concentration beforehand, and administration was carried out by back-fill which utilizes diffusion to reach the channel. With this method, the concentration of the peptide inside the pipette reaches equilibrium 15 to 20 minutes after the start of diffusion, and so the dissociation constant of the peptide can be estimated from the inhibition ratio at 20 minutes and onwards. Or, the relative inhibition of the peptide can be estimated from the time taken for inhibition. If the exact dissociation constant of the peptide is to be calculated, it is necessary to prepare an outside-out excised patch, take single channel current recordings, analyze the inhibition effects of various peptides with different concentration, and obtain a dose-inhibition curve; however, as this method requires special technology and as this is the primary screening of the various designed synthetic peptides, the assay method combining the inside-out excised patch and back-fill described above was used to make a rough estimate of the inhibition effects of the peptides. Taking into consideration the results obtained for GsMTx-4, the concentration of the peptide was maintained at $10\mu\text{M}$. Concerning the scale of evaluation, the channel's open probability (P_o , indicated in percentage) was

used, and the level of inhibition was expressed by the inhibition ratio (percentage) with the control (prior to the administration of the peptide) as the standard, or by the time taken for inhibition.

[0061]

(Results of the assay)

Of the five designed synthetic peptides, TVP003, TVP004 and TVP005 displayed inhibiting activity. The inhibiting activity of TVP003 is shown in Fig. 8. Fig. 8(a) is a representation of single channel current recordings. Fig. 8(b) represents the channel's open probability (P_o). As indicated in Fig. 8, TVP003 showed 100 % inhibition after 8 minutes, and so the dissociation constant of TVP003 was estimated as μM order or lower. It is suggested from this value that TVP003 shows inhibiting activity of a level the same as or higher than the natural peptide from spider venom, GsMTx-4.

[0062]

The inhibiting activity of TVP004 is shown in Fig. 9. Fig. 9(a) is a representation of the single channel recordings. Fig. 9(b) represents the channel's open probability (P_o). As indicated in Fig. 9, at $10\mu\text{M}$, TVP004 showed inhibition activity of about 60% after 8 minutes, and 95% after 16 minutes, displaying a relatively high level of inhibition activity.

[0063]

The inhibition activity of TVP005 is shown in Fig. 10. Fig. 10(a) is a representation of the single channel recordings. Fig. 10(b) represents the channel's open probability (P_o). As indicated in Fig. 10, TVP005 showed about 60% inhibition after 20 minutes, and so the dissociation constant thereof was estimated as approximately about $10\mu\text{M}$.

[0064]

[Effect of the Invention]

According to the present invention, it is possible to obtain a novel polypeptide that specifically inhibits the activity of a mechano-sensitive channel.

[0065]

Utilizing a polynucleotide encoding such a polypeptide of the present invention, a recombinant vector comprising this polynucleotide, and a transformant transformed by the recombinant vector, the polypeptide of the present invention can be produced in large quantities.

[0066]

A mechano-sensitive channel inhibitor comprising the polypeptide of the present invention or salts of the polypeptide of the present invention is useful for manufacturing a reagent related to a mechano-sensitive channel.

[0067]

A remedy for atrial fibrillation comprising the polypeptide of the present invention or salts of the polypeptide of the present invention can efficiently treat atrial fibrillation.

[0068]

[Sequence listing]

SEQUENCE LISTING

<110> Pharmadesign, Inc.,

<120> Low Molecule Polypeptide for Active Channel Blocker

<130> P03-0030

<140>

<141>

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

Polypeptide

<400> 1

Trp Lys Cys Asn Pro Asn Asp Asp Lys Cys

1 5 10

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

Polypeptide

<400> 2

Cys Ala Arg Pro Lys Leu Lys Cys

1 5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 3

Trp	Lys	Cys	Asn	Pro	Asn	Asp	Asp	Lys	Ala	Ala	Arg	Pro	Lys	Leu	Lys
1				5				10					15		

Cys

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Grammostola spatulata

<400> 4

Gly	Cys	Leu	Glu	Phe	Trp	Trp	Lys	Cys	Asn	Pro	Asn	Asp	Asp	Lys	Cys
1				5				10					15		

Cys	Arg	Pro	Lys	Leu	Lys	Cys	Ser	Lys	Leu	Phe	Lys	Leu	Cys	Asn	Phe
			20					25					30		

Ser Ser Gly

35

<210> 5

<211> 42

<212> PRT

<213> Atrax robustus

<400> 5

Cys Ala Lys Lys Arg Asn Trp Cys Gly Lys Asn Glu Asp Cys Cys Cys

1

5

10

15

Pro Met Lys Cys Ile Tyr Ala Trp Tyr Asn Gln Gln Gly Ser Cys Gln

20

25

30

Thr Thr Ile Thr Gly Leu Phe Lys Lys Cys

35

40

<210> 6

<211> 42

<212> PRT

<213> Hadronyche versuta

<400> 6

Cys Ala Lys Lys Arg Asn Trp Cys Gly Lys Thr Glu Asp Cys Cys Cys

1

5

10

15

Pro Met Lys Cys Val Tyr Ala Trp Tyr Asn Glu Gln Gly Ser Cys Gln
20 25 30

Ser Thr Ile Ser Ala Leu Trp Lys Lys Cys
35 40

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> Heteropodidae veratoria

<400> 7

Asp Asp Cys Gly Lys Leu Phe Ser Gly Cys Asp Thr Asn Ala Asp Cys
1 5 10 15

Cys Glu Gly Tyr Val Cys Arg Leu Trp Cys Lys Leu Asp Trp
20 25 30

<210> 8

<211> 32

<212> PRT

<213> Selenocosmia huwena

<400> 8

Gly Cys Leu Gly Asp Lys Cys Asp Tyr Asn Asn Gly Cys Cys Ser Gly
1 5 10 15

Tyr Val Cys Ser Arg Thr Trp Lys Trp Cys Val Leu Ala Gly Pro Trp
 20 25 30

<210> 9

<211> 37

<212> PRT

<213> Agelenopsis aperta

<400> 9

Ala Cys Val Gly Glu Asn Gln Gln Cys Ala Asp Trp Ala Gly Pro His
 1 5 10 15

Cys Cys Asp Gly Tyr Tyr Cys Thr Cys Arg Tyr Phe Pro Lys Cys Ile
 20 25 30

Cys Arg Asn Asn Asn
 35

<210> 10

<211> 37

<212> PRT

<213> Agelenopsis aperta

<400> 10

Ala Cys Val Gly Glu Asn Gln Gln Cys Ala Asp Trp Ala Gly Pro His

1 5 10 15

Cys Cys Asp Gly Tyr Tyr Cys Thr Cys Arg Tyr Phe Pro Lys Cys Ile

20 25 30

Cys Arg Asn Asn Asn

35

<210> 11

<211> 37

<212> PRT

<213> Agelenopsis aperta

<220>

<221> UNSURE

<222> (37)

<223> Xaa represents unknown amino acid residue

<400> 11

Glu Cys Val Pro Glu Asn Gly His Cys Arg Asp Trp Tyr Asp Glu Cys

1 5 10 15

Cys Glu Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Gln Pro Pro Lys Cys Ile Cys

20 25 30

Arg Asn Asn Asn Xaa

35

<210> 12

<211> 33

<212> PRT

<213> Selenocosmia huwena

<400> 12

Ala Cys Lys Gly Val Phe Asp Ala Cys Thr Pro Gly Lys Asn Glu Cys

1

5

10

15

Cys Pro Asn Arg Val Cys Ser Asp Lys His Lys Trp Cys Lys Trp Lys

20

25

30

Leu

<210> 13

<211> 37

<212> PRT

<213> Selenocosmia huwena

<400> 13

Leu Phe Glu Cys Ser Phe Ser Cys Glu Ile Glu Lys Glu Gly Asp Lys

1

5

10

15

Pro Cys Lys Lys Lys Lys Cys Lys Gly Gly Trp Lys Cys Lys Phe Asn

20

25

30

Met Cys Val Lys Val

35

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

Polypeptide

<400> 14

Gly Cys Leu Glu Phe Trp Trp Lys Ala Asn Pro Asn Asp Asp Lys Ala

1

5

10

15

Cys

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

Polypeptide

<400> 15

Cys Ala Arg Pro Lys Leu Lys Ala Ser Lys Leu Phe Lys Leu Cys

1

5

10

15

[0069]

[Brief Description of the Drawings]

[Fig. 1] Fig. 1 is a representation of the ten prospective multiple alignments showing high homology to GsMTx-4

[Fig. 2] Fig. 2 is a representation of the alignment of 1QK6 and GsMTx-4.

[Fig. 3] Fig. 3 is a stereo view superimposing Huwentoxin-I and GsMTx-4.

[Fig. 4] Fig. 4 is a Ca trace of the model of the superimposed Huwentoxin-I and GsMTx-4. In Fig. 4, the thin lines indicate the template and the thick lines indicate GsMTx-4.

[Fig. 5] Fig. 5 is a representation of the vicinity of Arg20 considered to be the activity center of Huwentoxin-I. In Fig. 5, the thin lines indicate Huwentoxin-I and the thick lines indicate GsMTx-4.

[Fig. 6] Figs. 6(a) to 6(d) are representations of the surface structure of a model with Huwentoxin-I (PDB code: 1QK6) as the template. In Figs. 6(a) to 6(d), the left side indicates Huwentoxin-I, and the right side indicates GsMTx-4. Fig. 6(a) is a view of the model from a hydrophobic patch (approximately the same direction as the drawings above). Fig. 6(b) is a view of the model rotated +90° around the x-axis. Fig. 6(c) is a view of the model rotated +90° around the y-axis. Fig. 6(d) is a view of the model rotated 180° around the y-axis.

[Fig. 7] Fig. 7 is a representation of the structure of GsMTx-4 and the structures of the designed peptides.

[Fig. 8] Figs. 8(a) and 8(b) are representations of the inhibiting activity of TVP003. Fig. 8(a) is a representation of the single channel current recordings. Fig. 8(b) represents the channel's open probability (Po).

[Fig. 9] Figs. 9(a) and 9(b) are representations of the inhibiting activity of TVP004. Fig. 9(a) is a representation of the single channel current recordings. Fig. 9(b) represents the channel's open probability (Po).

[Fig. 10] Figs. 10(a) and 10(b) are representations of the inhibiting activity of TVP005. Fig 10(a) is a representation of the single channel current recordings. Fig. 10(b) represents the channel's open probability (P_o).



[Document Name]

Drawings

[Fig. 1]

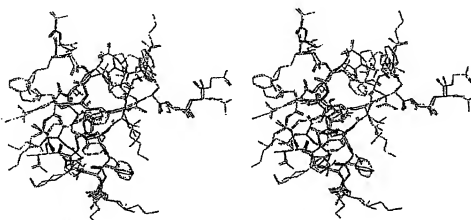
1QDP_	CAKKRNWGG-KNEDSGP-MKCIYAWYNGQGSQYITITGLFKKC	SEQ ID NO:5
1VTX_	CAKKRNWGG-KTEDSGP-MKGVYAWYNEGGSQASTISALWKKC	SEQ ID NO:6
1EMX_A	DDPGKLFSGED-TNADSEG-YVER-LHEK-LD-W	SEQ ID NO:7
1QK7_A	GG-LGDKED-YNNGESG-YVSRITW-KNGY-LAGPW	SEQ ID NO:8
1EITU_	AGVENGQCADW-AGPHSGG-YVETERTP-PKTIKRNAN	SEQ ID NO:9
1EITV_	AGVENGQCADW-AGPHSGG-YVETERTP-PKTIKRNAN	SEQ ID NO:10
1EIT_	EGVPENGHGRDW-YD-ECEG-FYSSGCP-PKTIKRNAN	SEQ ID NO:11
1QK6_A	ACKGVFDACP-GKNECCPN-RVSDKH-KTKWKL	SEQ ID NO:12
GSMTX4	GCLEFWWKCNP-NDDKCCRPKLCKSLFKLCNFSSG	SEQ ID NO:4
1I25_A	LFPS-PSRIEKEGDKPKR-KKXGGT-KKPNMCVKV	SEQ ID NO:13

[Fig. 2]

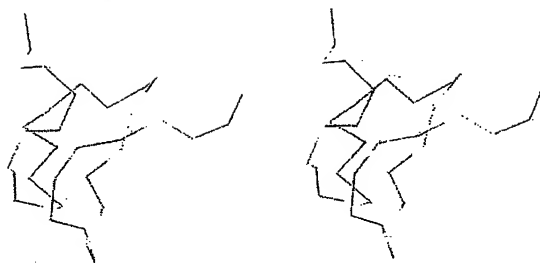
Alignment of 1QK6 and GsMTx-4

1QK6	ACKGVFDACP-GKNECC-PNVCSDKHKWKWKL-	SEQ ID NO:12
GSMTX4	GCLEFWWKCNPNDKCCRPKLCKSLFKLCNFSSG	SEQ ID NO:4
.*.:**..:***: **. **.*:1.		% identity: 30.3
(Alignment : Clustalw 1.81)		

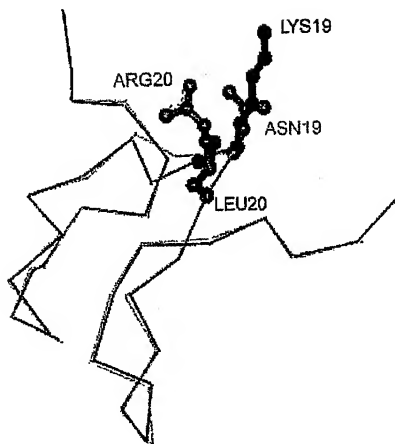
[Fig. 3]



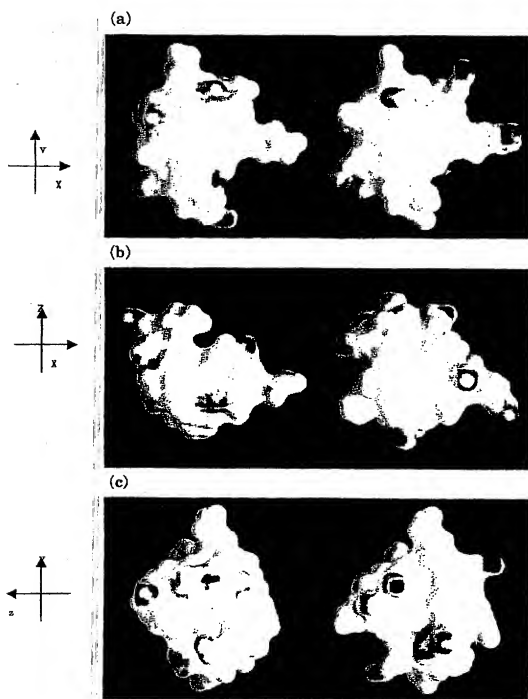
[Fig. 4]



[Fig. 5]

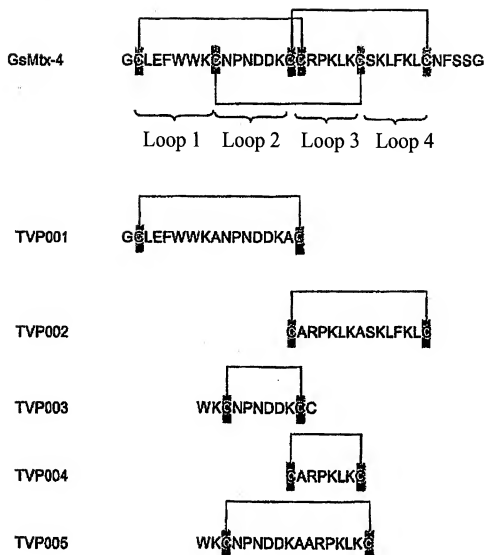


[Fig. 6]

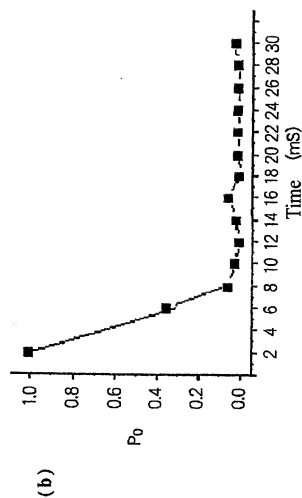
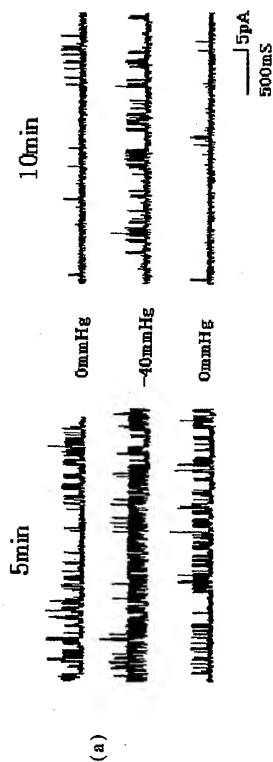




[Fig. 7]

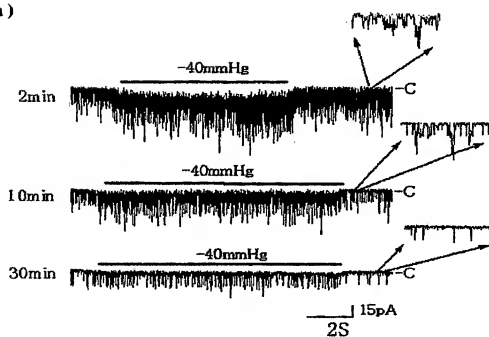


[Fig. 8]

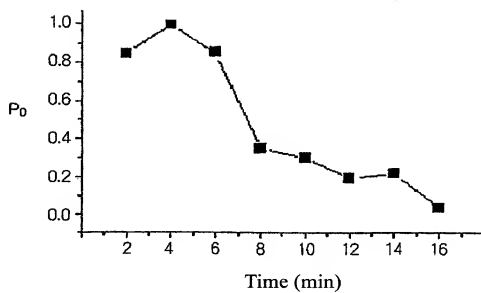


[Fig. 9]

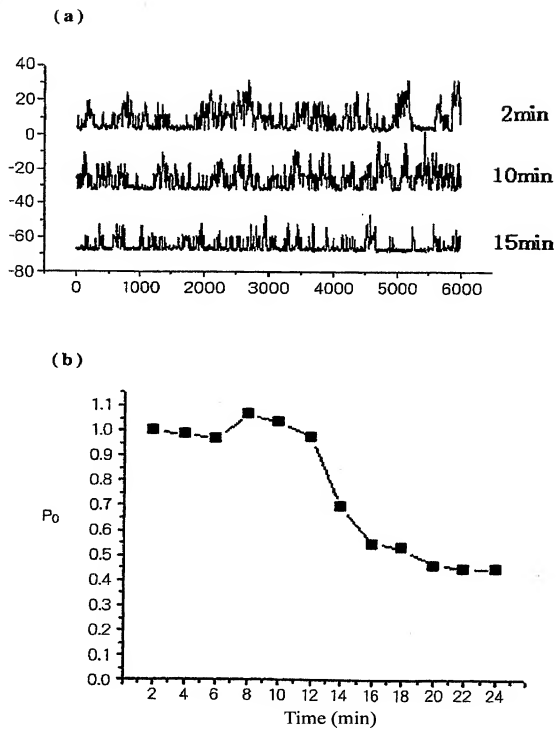
(a)



(b)



[Fig. 10]



[Document Name] Abstract

[Problem] To provide novel polypeptides that specifically inhibit the activity of a mechano-sensitive channel, a mechano-sensitive channel inhibitor and a remedy of atrial fibrillation comprising one or more of the polypeptides or salts thereof.

[Solution Means] A polypeptide or salts thereof consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3, a mechano-sensitive channel inhibitor and a remedy of atrial fibrillation comprising the polypeptide or salts thereof, and the like.

[Selected Figure] Fig. 7



Tokugan 2003-085666

PAGE:

1/

[Document Name]	Amendment
[Reference Number]	P03-0030
[Filing Date]	April 2, 2003 (<i>Heisei</i> 15)
[Destination]	Commissioner of Patent Office
[Indication of Case]	
[Application Number]	Tokugan 2003-85666
[Person Making Amendment]	
[ID Number]	500386563
[Name]	PHARMADESIGN, INC.
[Attorney]	
[ID Number]	100092783
[Name]	Hiroshi Kobayashi
[Telephone Number]	03-3273-2611

[Amendment 1]

[Amended Document Name]	Japanese Patent Application
[Amended Item Name]	Inventor
[Method of Amendment]	Change
[Content of Amendment]	

[Inventor]

[Address]	c/o PHARMADESIGN, INC., Dai-2 Goseki Bldg., 4-2-10, Hatchobori, Chuo-ku, Tokyo 104-0032 JAPAN
[Name]	Yokotagawa, Takane

[Inventor]

[Address]	c/o Cellular Biophysics Class, Department of Physiology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65, Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya-shi, Aichi 466-0065 JAPAN
[Name]	Sokabe, Masahiro

[Inventor]

[Address]	c/o PHARMADESIGN, INC., Dai-2 Goseki Bldg., 4-2-10, Hatchobori, Chuo-ku, Tokyo 104-0032 JAPAN
-----------	---

[Name]	Furuya, Toshio
--------	----------------

[Others]

Description of inventor at the time of filing of the application included a clerical error, which is now amended.

[Proof]

Need

Finding/Additional Information

Patent Application Number	Tokugan 2003-085666
Number of Acceptance	50300549133
Document Name	Amendment
Officer In Charge	Kouji Seki 7475
Creation Date	April 14, 2003 (Heisei 15)

<Finding Information/Additional Information>

[Person Making Amendment]

[ID Number]	500386563
[Address]	3F Dai-2 Goseki Bldg., 4-2-10, Hatchobori, Chuo-ku, Tokyo 104-0032 JAPAN
[Name]	PHARMADESIGN, INC.
[Attorney]	Requester
[ID Number]	100092783
[Address]	c/o Abe, Ikubo & Katayama, Fukuoka Bldg., 9th Floor, 8-7, Yaesu 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-0028 JAPAN
[Name]	Hiroshi Kobayashi

Applicant History Information

ID Number	500386563
1. Date of Change	August 15, 2000
[Reason for Change]	New Registration
Address	3F Dai-2 Goseki Bldg., 4-2-10, Hatchobori, Chuo-ku, Tokyo 104-0032 JAPAN
Name	PHARMADESIGN, INC.
2. Date of Change	April 23, 2003
[Reason for Change]	Address Change
Address	5F Haseko Hatchobori Bldg., 19-8, Hatchobori 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-0032 JAPAN
Name	PHARMADESIGN, INC.

PCT/JP2004/004190

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

25.3.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 2 6 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 8 5 6 6 6
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 0 8 5 6 6 6]

出 願 人 株式会社ファルマデザイン
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 21 MAY 2004

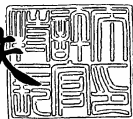
WIPO

PCT

2 0 0 4 年 4 月 2 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 4 - 3 0 3 6 6 6 4

【書類名】 特許願

【整理番号】 P03-0030

【提出日】 平成15年 3月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 38/17

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区八丁堀 4-2-10 第二後関ビル 株式会社ファルマデザイン内

【氏名】 原 高峰

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65 名古屋大学大学院医学系研究科 細胞生物物理学教室内

【氏名】 曾我部 正博

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区八丁堀 4-2-10 第二後関ビル 株式会社ファルマデザイン内

【氏名】 古谷 利夫

【特許出願人】

【識別番号】 500386563

【氏名又は名称】 株式会社ファルマデザイン

【代理人】

【識別番号】 100092783

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 浩

【電話番号】 03-3273-2611

【選任した代理人】

【識別番号】 100095360

【弁理士】

【氏名又は名称】 片山 英二

【選任した代理人】

【識別番号】 100093676

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 純子

【選任した代理人】

【識別番号】 100116850

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣瀬 隆行

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 157061

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0201166

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 イオンチャネルの活性を阻害する低分子ペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩。

【請求項2】 配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩。

【請求項3】 配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるものではなく、かつ機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩。

【請求項4】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

【請求項5】 請求項4に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項6】 請求項5に記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。

【請求項7】 請求項1～請求項3のいずれか1項に記載のポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩のうちいずれか1つ以上を含有する機械刺激感受性チャネル阻害剤。

【請求項8】 請求項1～請求項3のいずれか1項に記載のポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩のうちいずれか1つ以上を含有する心房細動の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチド、このポリペプチドを含む機械刺激感受性チャネル阻害剤および心房細動の治療剤などに関するものである。より詳しくは、本発明は、クモ毒由来の天然ペプチド(GsMTx-4)の配列をベースにして機械刺激感受性チャネルに作用するファーマコフォアを特定し、そのファーマコフォアを構成するようにデザインされ、かつ

心房細動の治療に有用な新規ポリペプチドなどに関する。

【0002】

【従来の技術】

心房細動は、不整脈の一種であり、加齢とともにその有病率は高くなる。心房細動は、高齢者（65歳以上）の約3%に認められる心臓疾患である。心房細動が慢性化すると血栓を形成し、脳塞栓症を引き起こすため、現在では心房細動が重症脳卒中患者の主要な原因疾患と考えられている。このように心房細動は、脳梗塞などの合併症の発生頻度と重症度を考慮し、近年致死性不整脈のひとつとして認識されるようになった（J. Nippon. Med. Sch. 2002, 69(3)）。これまでに心房細動を根治するような治療薬は得られておらず、心房細動、特に慢性心房細動に対する薬物療法には限界があると考えられていた（同前）。

【0003】

心房細動は、心筋に存在するイオンチャネルの働きの異常が原因のひとつと考えられている。一方、クモ毒由来の天然ペプチド（GsMTx-4：配列番号4）が、機械刺激感受性チャネル（Stretch-Activated Channel: SAC）の活性を阻害することが知られている（例えば、Thomas M. Suchyna et. al., Identification of a Peptide Toxin from Grammostola Spatulata Spider Venom that Blocks Cation-selective Stretch-activated Channels, J. Gen. Physiol., Vol. 115, pp583-598, 2000（非特許文献1）参照）。また、同文献には、陸上及び水中の動物由来の毒液由来の毒素を構成するペプチドには、6つのシステインを含むICK（Inhibitor Cysteine Knot：インヒビターシステインノット）モチーフが共通して見出されることが記載されている（非特許文献1の590頁右欄下から7行目～下から3行目、および図30）。また、同文献には、GsMTx-4が、3つのシステインペア（C₁-C₄、C₂-C₅及びC₃-C₆）によって定義される基本構造を有するICK（Inhibitor Cysteine Knot）コンセンサスシステインモチーフを有することが示唆されている（非特許文献1の595頁左欄7行目から下から11行目、「GsMTx-4の構造」の欄）。

【0004】

また、GsMTx-4を抽出・精製等する方法や、そのGsMTx-4を用い

で心臓不整脈を治療する方法などが提案されている（例えば、Bode et al, nature, Vol. 409, pp35-36, 2001. (非特許文献2)、米国特許出願公開第2002/0077286号明細書（特許文献1）参照。）。また、GsMTx-4の構造は、NMRを用いた溶液中での結果が知られている（Robert et.al, J. Biol. Chem. Vol37, pp3443-34450, 2002. (非特許文献3）参照。）このような知見にかかわらず、クモ毒由来のペプチド（GsMTx-4）を用いた心房細動の治療剤は開発されていなかった。

【0005】

【特許文献1】

米国特許出願公開第2002/0077286号明細書

【非特許文献1】

Thomas M. Suchyna et. al., Identification of a Peptide Toxin from Gram mostola Spatulata Spider Venom thet Blocks Cation-selective Stretch-activated Channels, J. Gen. Physiol., Vol. 115, pp583-598, 2000

【非特許文献2】

Bode et al, nature, Vol. 409, pp35-36, 2001.

【非特許文献3】

Robert et.al, J. Biol. Chem. Vol37, pp3443-34450, 2002.

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明では、GsMTx-4のファーマコフォア（活性に必要最低限の空間構造）を同定し、ファーマコフォア情報に基づいて機械刺激感受性チャネルの活性を特異的に阻害する新規ポリペプチドを設計し、このようなポリペプチドを含む心房細動の治療剤などを提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記課題は、以下の発明により解決される。

(1) 本発明の第1の実施態様に係る発明は、「配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または当該ポリ

ペプチドの塩」である。これらのポリペプチドは、本明細書の実施例で確認されたとおり、機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチドであり、GsMTx-4のファーマコフォアを構成するポリペプチドであると考えられる。これらのポリペプチドは、心房細動の治療などに有用である。

(2) 本発明の第2の実施態様に係る発明は、「配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩」である。

(3) 本発明の第3の実施態様に係る発明は、「配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるものではなく、かつ機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩」である。

(4) 本発明の第4の実施態様に係る発明は、「上記(1)に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド」である。

(5) 本発明の第5の実施態様に係る発明は、「上記(4)に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター」である。

(6) 本発明の第6の実施態様に係る発明は、「上記(5)に記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体」である。

(7) 本発明の第7の実施態様に係る発明は、「上記(1)～上記(3)のいずれか1項に記載のポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩のうちいずれか1つ以上を含有する機械刺激感受性チャネル阻害剤」である。この阻害剤は、機械刺激感受性チャネルの活性を特異的に阻害するので、機械刺激感受性チャネルの研究などに有効に用いられる。

(8) 本発明の第8の実施態様に係る発明は、「上記(1)～上記(3)のいずれか1項に記載のポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩のうちいずれか1つ以上を含有する心房細動の治療剤」である。これらのポリペプチドは、本明細書の実施例で、その機能が確認されたとおり、機械刺激感受性チャネル阻害活性を有する。したがって、この治療剤は、心房細動の治療に有効に用いることができる。

【0008】

【発明の実施の形態】

(本発明のポリペプチド)

本発明のポリペプチドは、配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるものではなく、かつ機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチド（すなわち、本発明の第1～第3の実施態様に係る発明に関するポリペプチド）である。

【0009】

また、本発明のペプチドは、C末端がカルボキシル基（ -COOH ）、カルボキシレート（ -COO^- ）、アミド（ -CONH_2 ）またはエステル（ -COR ）などであってもよい。

本発明のペプチドには、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているものも含まれる。本発明のペプチドには、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したものも含まれる。本発明のペプチドには、側鎖上の置換基が、適当な保護基で保護されているものも含まれる。本発明のペプチドには、糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドも含まれる。

【0010】

本発明のペプチドの塩における「塩」としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、好ましくは生理学的に許容される酸付加塩である。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが挙げられる。

【0011】

(本発明のポリペプチドの合成)

本発明のポリペプチドは、化学的に合成してもよいし、組換えDNA技術を用いて製造してもよい。本発明のポリペプチドを化学的に合成するためには、公知の方法に従って合成すればよく、例えば、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混酸無水物法、DCC法、活性エステル法、ウッドワード試薬Kを用いる方法、カルボニルイミダゾール法、酸化還元法、DCC/HONB法、BOP試薬を用いる方法などにより、本発明のペプチドを得ることができる(例えば、Bodanszky, M and M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966)、Schroeder and Luebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965)、F. M. Finn 及びK. Hofmann 著、The Proteins、第2巻、H. Nenrath、R. L. Hill 編集、Academic Press Inc., New York (1976)；泉屋信夫他著「ペプチド合成の基礎と実験」丸善(株)1985年；矢島治明、榊原俊平他著、生化学実験講座1、日本生化学会編、東京化学同人1977年；木村俊他著、続生化学実験講座2、日本生化学会編、東京化学同人1987年などを参照)。また、自動ペプチド合成装置(PEアプライドバイオシステムズ社等)により化学合成することもできる。

【0012】

また、反応後は、公知の精製法により本発明のポリペプチドを精製単離することができる。例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のポリペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる本発明のペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0013】

(ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド)

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、本発明のポリペプチドをコードする塩基配列(DNAまたはRNA、好ましくはDNA)を含むものであればいかなるものであってもよい。このようなポリヌクレオチドとしては、本発明のポリペプチドをコードするDNA、mRNA等のRNAが挙げられ、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖D

NA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖(すなわち、コード鎖)であっても、アンチセンス鎖(すなわち、非コード鎖)であってもよい。

【0014】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のポリペプチドのmRNAを定量することができる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction(以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

【0015】

本発明のポリペプチドをコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のペプチドをコードするDNAの塩基配列の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅する方法が挙げられる。また適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別し本発明のポリペプチドをコードするDNAのクローニングを行ってもよい。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

【0016】

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、MutantTM-

super Express Km (宝酒造 (株))、MutantTM-K (宝酒造 (株))等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じた方法に従って行なうことができる。

クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。このようなDNAは、その5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、そのDNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

[0017]

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pCR4、pCR2.1、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。

[0018]

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

。

これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好

ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0019】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

【0020】

このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0021】

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、

昆虫、動物細胞などが用いられる。

【0022】

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)], DH5 α [Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., Gene, 96, 23-28(1990)], DH10B [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 87巻, 4645-4649(1990)] などが用いられる。

【0023】

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

【0024】

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シズサッカロマイセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC 1913, NCYC 2036、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

【0025】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中

腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。そのSf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

【0026】

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592 (1985)]。

【0027】

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr-) 細胞と略記)、マウスL細胞、マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

【0028】

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972) やジーン (Gene), 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

【0029】

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。

【0030】

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978)

などに記載の方法に従って行なうことができる。

【0031】

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

【0032】

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル、263-267 (1995) (秀潤社発行)、ウイルス学 (Virology) , 52巻, 456 (1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

【0033】

このようにして、本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

【0034】

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中にはその形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5〜8が望ましい。

【0035】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

【0036】

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行なっており、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

【0037】

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

【0038】

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0039】

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行なっており、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0040】

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM培地 [ウイルス学 (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・

ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)) などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行なって、必要に応じて通気や搅拌を加える。

【0041】

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のポリペプチドを生成させることができる。

【0042】

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

【0043】

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0044】

このようにして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

【0045】

なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えることや、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

【0046】

このようにして生成する本発明のポリペプチドまたはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0047】

(機械刺激感受性チャネル阻害剤)

機械刺激感受性チャネル阻害剤としては、本発明のポリペプチド、もしくはそれらの塩のうちいずれか1つ以上（以下、「本発明のポリペプチド等」ともいう。）を含有するものが挙げられる。本発明のポリペプチド等は、機械刺激感受性チャネル阻害剤として使用できる。本発明のポリペプチド等は、取り扱いが容易であり、後の実施例で示されるように高い阻害活性を有する。

【0048】

(心房細動の治療剤)

心房細動の治療剤としては、本発明のポリペプチド、もしくはその塩のいずれか1つ以上を含有するものが挙げられる。

本発明のポリペプチドを含む心房細動の治療剤は、注射液などの形で非経口的に心房の血管等に投与するか、錠剤、カプセル剤など経口投与により使用できる。注射用製剤の場合は単位投与量アンプル又は多投与量容器の状態で提供されてもよい。また、ヒトのみならずヒト以外の哺乳動物に対しても投与することがで

きる。これら製剤化については、公知の製剤化方法を採用することができる。

【0049】

これらの各種製剤は、製剤上通常用いられる賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、潤滑剤、界面活性剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤、等張化剤などを適宜選択し、常法により製造することができる。上記各種製剤は、医薬的に許容される担体又は添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリアルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトースなどが挙げられる。使用される添加物は、本発明の剤型に応じて上記の中から適宜又は組み合わせで選択される。

【0050】

上記のような剤型において、活性成分である本発明のポリペプチドは、剤型中例えば、0.01重量%～100重量%、好ましくは0.1重量%～90重量%、より好ましくは1重量%～50重量%含まれる。

【0051】

本発明のポリペプチドの投与量は、非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、心房細動患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与する。経口投与の場合、例えば、心房細動患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。

本発明の心房細動の治療剤は、好ましくは1日1回から数回に分けて1日以上投与される。

【0052】

(ファルマコフォアの同定)

なお、本発明のポリペプチドを設計するに当り、クモ毒ペプチド(GsMTx-4)のどの部位が活性に必要な最小単位となるファルマコフォアであるのかを、立体構造に基づいて精度良く予測した。

ファルマコフォアの同定は、例えば以下のようにして行なうことができる。まず、立体構造既知の類縁ペプチドの立体構造を鋳型としたホモロジーモデリング法によるクモ毒ペプチドの精密な構造予測を行なう。その結果、得られた構造に基づいて、活性部位を改変したペプチドの機能解析を行い、医薬品設計のターゲットとなる部位の絞り込みを行なう。また、GsMTx-4のジスルフィド結合の部分にミミックした設計を行い、安定な構造をもつペプチドをデザインする。GsMTx-4は3つのジスルフィド結合を持つ比較的柔軟性の低い立体構造を有することが知られているため、一般的に結合に関与することが多い極性アミノ酸残基を含む環状ペプチドをいくつかデザインし、活性に必要なファルマコフォアの同定を行なう。

【0053】

(活性の測定)

本発明のペプチドの活性評価方法としては、公知の活性評価方法を用いることができるが、好ましくは実施例1に記載されたパッチクランプ法による単一チャネル電流記録法を用いることができる。

【0054】

【実施例】

(実施例1)

実施例1:クモ毒ペプチド(GsMTx-4)配列と一致度の高い構造既知の類縁ペプチドの検索

配列番号4で表されるGsMTx-4のアミノ酸配列と一致度の高い構造について、PDB(タンパク質立体構造データベース)からクモ毒を対象に検索した。この結果、GsMTx-4と相同性の高い10の候補が上がった。これら候補のマルチプルアライメントの結果を以下の図1に示す。

図1に示す配列の中から、システイン残基が一致していて、なおかつシステイン残基間の長さがほぼ等しく、挿入欠失のない (GsMtx4の方が1残基長い) 1QK6 (Huwentoxin-I: 配列番号12) を鋳型として選択し、ホモロジーモデリング法によりファーマコフォアの絞込みを行った。

【0055】

実験例2: クモ毒ペプチド (GsMTx-4) の立体構造予測

鋳型ペプチド1QK6を用いてホモロジーモデリングを行った。まず、1QK6とGsMTx-4とのアラインメントを行った。その結果を図2に示す。

【0056】

次に、プログラムMODELLERを用いてモデル構造の構築を行った。構築したGsMTx-4の構造モデルと鋳型に用いたHuwentoxin-Iとの重ね合わせた結果を図3および図4に示す。図3は、Huwentoxin-IとGsMtx-4を重ね合わせたステレオ図である。図4は、Huwentoxin-IとGsMtx-4を重ね合わせたモデルのC α トレースを示す。図4中、薄い線は鋳型を表し、濃い線はGsMtx-4を表す。

【0057】

また、図5にはHuwentoxin-Iで活性中心と考えられるArg20近傍の様子を示す。図5中、薄い線はhuwentoxin-Iを表し、濃い線はGsMtx-4を表す。さらに、Huwentoxin-IとGsMTx-4の表面構造を比較した結果を図6に示す。図6(a)～図6(d)において、左がhuwentoxin-I、右がGsMtx-4を表す。図6(a)は、hydrophobic patchから見たもの(上の図とはほぼ同じ向き)を表す。図6(b)は、x軸の周りに+90°回転したものを表す。図6(c)は、y軸の周りに+90°回転したものを表す。図6(d)は、y軸の周りに180°回転したものを表す。図6(b)から両ペプチドの分子の形状はかなり異なっていることがわかる。また解離性側鎖を持つ残基の分布も異なっており、特異性決定に関係していることが推測できる。

【0058】

また、Robert et.al, J. Biol. Chem. Vol37, pp3443-34450, 2002. (上記非特許文献3)に開示されたGsMTx-4のNMRによる溶液中の構造と、本実施例により求められたGsMTx-4の構造を比較すると、本発明において構築

したモデリング構造は、実際のGsMTx-4の構造を反映していると判断できる。

【0059】

実験例3：活性ペプチドのデザインとファーマコフォアの同定

上述のGsMTx-4のモデリング構造に基づいてペプチド断片のおおよその設計方針を決定した。図7に、GsMTx-4の構造およびデザインしたペプチドの構造を表す。GsMTx-4は、3つのジスルフィド結合により、図7の配列構式に示すように4つのループ部分から成っている。したがって、GsMTx-4のどのループ部分が阻害活性に寄与する部分であるかを調べるためにTVP001からTVP005の5つのペプチドをデザインした。これらのペプチドについては、ループを構成しない部位にあるシステインをアラニンに置換している。TVP001（配列番号14）はループ1と2、TVP002（配列番号15）はループ3と4、TVP003（配列番号1）はループ2、TVP004（配列番号2）はループ3、TVP005（配列番号3）はループ2と3から成っている。

【0060】

（デザインしたペプチドのバイオアッセイ）

ペプチドの活性評価には、最も信頼性の高いパッチクランプ法による単一チャネル電流記録法を用いた。アッセイの対象としては、心筋由来のCa²⁺依存性BigKチャネル（Kawakubo et. Am J Physiol, 276:H1827.1999）を用いた。このチャネルを、発現しているニワトリの心室筋、もしくはこのチャネルのcDNAを強制発現したCHO細胞にセルアタッチトパッチクランプ法を適用した後、inside-out引きちぎりパッチ膜(excised patch)を形成し、膜電位固定下で単一チャネル電流を計測した。デザインした合成ペプチドはGsMTx-4と同様、細胞外からチャネルをブロックするものと想定し、予め記録用ガラスピペットの一定位置以上の空間に既知濃度のペプチドを充填して、拡散によりチャネルに到達させるバックフィル(back-fill)を用いて投与した。この手法では拡散開始後おおよそ15-20分でピペット内ペプチド濃度が平衡に達するので、20分後の抑制率からペプチドの解離定数を推定できる。あるいは抑制の時間経過からペプチドの相対的抑制力を推定することもできる。ペプチドの正確な解離定数を求めるには、outside-out

tの引きちぎりパッチ膜を形成して単一チャネル電流を計測し、種々の濃度のペプチドによる抑制効果を解析して用量-抑制曲線を求めなければならないが、この方法は格段の技術を要すること、今回は種々のデザインした合成ペプチドの一次スクリーニングであることから、前述のinside-out引きちぎりパッチにバックフィルを組み合わせたアッセイ法を使って、ペプチドの抑制効果について、おおよその見積もりを行った。ペプチドの濃度としては、GsMTx-4での結果を考慮して $10\mu\text{M}$ を用いた。評価量としては、チャネルの開確率(P_o 、パーセント表示)を用い、抑制の強さはコントロール(ペプチド投与前)を基準とした抑制率(パーセント)、あるいは抑制の時間経過で表現した。

【0061】

(アッセイ結果)

デザインした5種類の合成ペプチドのうち、TVP003、TVP004及びTVP005に阻害活性が認められた。図8は、TVP003の阻害活性検査結果を示す。図8(a)は、単一チャネル電流の計測結果を表す図である。図8(b)は、チャネルの開確立(P_o)を表す。図8に示すように、TVP003は8分後にはほぼ100%の抑制効果を示したことから、TVP003の解離定数は μM オーダーかそれ以下であると推定された。この値は、TVP003が、天然のクモ毒ペプチドGsMTx-4と同等かそれ以上の阻害活性を有することを示唆している。

【0062】

図9は、TVP004の阻害活性検査結果を示す図である。図9(a)は、単一チャネル電流の計測結果を表す。図9(b)は、チャネルの開確立(P_o)を表す。図9に示すようにTVP004は $10\mu\text{M}$ で8分後には約60%、16分後には95%の阻害活性を示し、比較的強い阻害活性を示した。

【0063】

図10は、TVP005の阻害活性検査結果を示す図である。図10(a)は、単一チャネル電流の計測結果を表す。図10(b)は、チャネルの開確立(P_o)を表す。図10に示すように、TVP005は、20分後に約60%の阻害効果を示したことから、その解離定数はおおよそ $10\mu\text{M}$ 程度と推定された。

【0064】

【発明の効果】

本発明によれば、機械刺激感受性チャネルの活性を特異的に阻害する新規ポリペプチドを得ることができる。

【0065】

このような本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、そのポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、その組換えベクターで形質転換させた形質転換体を用いれば、本発明のポリペプチドを大量に生産できる。

【0066】

本発明のポリペプチド、または本発明のポリペプチドの塩を含有する機械刺激感受性チャネル阻害剤は、機械刺激感受性チャネルに関する試薬を製造する際に有効である。

【0067】

本発明のポリペプチド、または本発明のポリペプチドの含有する心房細動の治療剤は、心房細動を効果的に治療することができる。

【0068】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Pharmadesign, Inc.,

<120> Low Molecule Polypeptide for Active Channel Blocker

<130> P03-0030

<140>

<141>

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 1

Trp Lys Cys Asn Pro Asn Asp Asp Lys Cys

1

5

10

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 2

Cys Ala Arg Pro Lys Leu Lys Cys

1

5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 3

Trp Lys Cys Asn Pro Asn Asp Asp Lys Ala Ala Arg Pro Lys Leu Lys

1

5

10

15

Cys

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Grammostola spatulata

<400> 4

Gly Cys Leu Glu Phe Trp Trp Lys Cys Asn Pro Asn Asp Asp Lys Cys

1

5

10

15

Cys Arg Pro Lys Leu Lys Cys Ser Lys Leu Phe Lys Leu Cys Asn Phe

20

25

30

Ser Ser Gly

35

<210> 5

<211> 42

<212> PRT

<213> Atrax robustus

<400> 5

Cys Ala Lys Lys Arg Asn Trp Cys Gly Lys Asn Glu Asp Cys Cys Cys

1

5

10

15

Pro Met Lys Cys Ile Tyr Ala Trp Tyr Asn Gln Gln Gly Ser Cys Gln

20

25

30

Thr Thr Ile Thr Gly Leu Phe Lys Lys Cys

35

40

<210> 6

<211> 42

<212> PRT

<213> Hadronyche versuta

<400> 6

Cys Ala Lys Lys Arg Asn Trp Cys Gly Lys Thr Glu Asp Cys Cys Cys

1

5

10

15

Pro Met Lys Cys Val Tyr Ala Trp Tyr Asn Glu Gln Gly Ser Cys Gln
20 25 30

Ser Thr Ile Ser Ala Leu Trp Lys Lys Cys
35 40

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> Heteropodidae veratoria

<400> 7

Asp Asp Cys Gly Lys Leu Phe Ser Gly Cys Asp Thr Asn Ala Asp Cys
1 5 10 15

Cys Glu Gly Tyr Val Cys Arg Leu Trp Cys Lys Leu Asp Trp
20 25 30

<210> 8

<211> 32

<212> PRT

<213> Selenocosmia huwena

<400> 8

Gly Cys Leu Gly Asp Lys Cys Asp Tyr Asn Asn Gly Cys Cys Ser Gly
1 5 10 15

Tyr Val Cys Ser Arg Thr Trp Lys Trp Cys Val Leu Ala Gly Pro Trp
20 25 30

<210> 9

<211> 37

<212> PRT

<213> Agelenopsis aperta

<400> 9

Ala Cys Val Gly Glu Asn Gln Gln Cys Ala Asp Trp Ala Gly Pro His
1 5 10 15

Cys Cys Asp Gly Tyr Tyr Cys Thr Cys Arg Tyr Phe Pro Lys Cys Ile
20 25 30

Cys Arg Asn Asn Asn
35

<210> 10

<211> 37

<212> PRT

<213> Agelenopsis aperta

<400> 10

Ala Cys Val Gly Glu Asn Gln Gln Cys Ala Asp Trp Ala Gly Pro His

1

5

10

15

Cys Cys Asp Gly Tyr Tyr Cys Thr Cys Arg Tyr Phe Pro Lys Cys Ile

20

25

30

Cys Arg Asn Asn Asn

35

<210> 11

<211> 37

<212> PRT

<213> Agelenopsis aperta

<220>

<221> UNSURE

<222> (37)

<223> Xaa represents unknown amino acid residue

<400> 11

Glu Cys Val Pro Glu Asn Gly His Cys Arg Asp Trp Tyr Asp Glu Cys

1

5

10

15

Cys Glu Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Gln Pro Pro Lys Cys Ile Cys

20

25

30

Arg Asn Asn Asn Xaa

35

<210> 12

<211> 33

<212> PRT

<213> Selenocosmia huwena

<400> 12

Ala Cys Lys Gly Val Phe Asp Ala Cys Thr Pro Gly Lys Asn Glu Cys

1

5

10

15

Cys Pro Asn Arg Val Cys Ser Asp Lys His Lys Trp Cys Lys Trp Lys

20

25

30

Leu

<210> 13

<211> 37

<212> PRT

<213> Selenocosmia huwena

<400> 13

Leu Phe Glu Cys Ser Phe Ser Cys Glu Ile Glu Lys Glu Gly Asp Lys

1

5

10

15

Pro Cys Lys Lys Lys Lys Cys Lys Gly Gly Trp Lys Cys Lys Phe Asn

20

25

30

Met Cys Val Lys Val

35

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

Polypeptide

<400> 14

Gly Cys Leu Glu Phe Trp Trp Lys Ala Asn Pro Asn Asp Asp Lys Ala

1

5

10

15

Cys

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 15

Cys Ala Arg Pro Lys Leu Lys Ala Ser Lys Leu Phe Lys Leu Cys

1 5 10 15

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、GsMTx-4と相同性の高い10の候補マルチプルアライメントの結果を示す図である。

【図2】図2は、1QK6とGsMTx-4とのアラインメントの結果を示す。

【図3】図3は、Huwentoxin-IとGsMtx-4を重ね合わせたステレオ図である。

【図4】図4は、Huwentoxin-IとGsMtx-4を重ね合わせたモデルのC α トレースを示す。図4中、薄い線は鋳型を表し、濃い線はGsMtx-4を表す。

【図5】図5は、Huwentoxin-Iで活性中心と考えられるArg20近傍を表す図である。図5中、薄い線はhuwentoxin-Iを表し、濃い線はGsMtx-4を表す。

【図6】図6(a)～図6(d)は、Huwentoxin-I (PDB code: 1QK6)を鋳型としたモデルの表面構造を表す図である。図6(a)～図6(d)において、左がhuwentoxin-I、右がGsMtx-4を表す。図6(a)は、hydrophobic patchから見たもの(上の図とはほぼ同じ向き)を表す。図6(b)は、x軸の周りに+90°回転したものを表す。図6(c)は、y軸の周りに+90°回転したものを表す。図6(d)は、y軸の周りに180°回転したものを表す。

【図7】図7は、GsMtx-4の構造およびデザインしたペプチドの構造を表す。

【図8】図8は、TVP003の阻害活性検査結果を示す図である。図8(a)は、単一チャネル電流の計測結果を表す。図8(b)は、チャネルの開確立(Po)を表す。

【図9】図9は、TVP004の阻害活性検査結果を示す図である。図9（a）は、単一チャネル電流の計測結果を表す。図9（b）は、チャネルの開確立（Po）を表す。

【図10】図10は、TVP005の阻害活性検査結果を示す図である。図10（a）は、単一チャネル電流の計測結果を表す。図10（b）は、チャネルの開確立（Po）を表す。

【書類名】 図面

【図1】

1QDP_	—CAKKRNWCG—KNEDECCP—MKCIYAVYNQGSQTITITGLFKKC	配列番号5
1VTX_	—CAKKRNWCG—KTEDCCCP—MKGVYAVYNEQGSQSTISALVKKC	配列番号6
1EMX_A	—DDCGKLFSGCD—TNADSSSG—YVER—LTPK—LD—W—	配列番号7
1QK7_A	—GG—LGDKED—YNNQSSSG—IVSRTW—KTEV—LAGPW—	配列番号8
1EIU_	—AGVGENQGSADW—AGPHDEG—YTERYP—PKIGERNNN—	配列番号9
1EIV_	—AGVGENQGSADW—AGPHDEG—YTERYP—PKIGERNNN—	配列番号10
1EIT_	—EVPENGHGRDW—YD—EDSG—FYSSGROP—PKIGERNNNK—	配列番号11
1QK6_A	—ACKGVFDACP—GKNEDCPN—RVSDKH—KWKWKL—	配列番号12
GSMTX4	—GCLFVWKNP—NDDCKCRPKLKSKLF—KLCNFSSG—	配列番号4
1I25_A	—LPEIS—FSCHIEKGDKPK—KKKGGW—KCKPNCVKY—	配列番号13

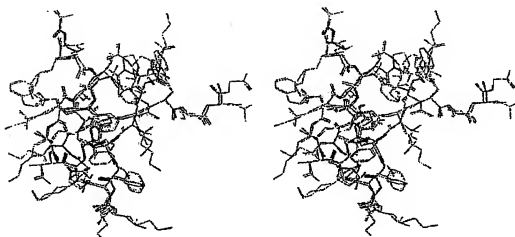
【図2】

1QK6とGsMTx-4とのアライメント

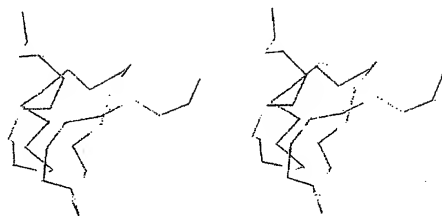
1QK6	ACKGVFDACP—GKNEDCPN—RVSDKH—KWKWKL—	配列番号12
GSMTX4	GCLFVWKNP—NDDCKCRPKLKSKLF—KLCNFSSG—	配列番号4
*.:**..***:*.**.*:1.		% identity: 30.3

(アラインメント: Clustalw 1.81)

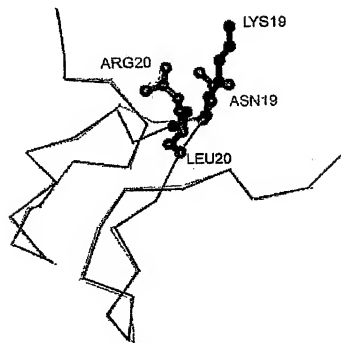
【図3】



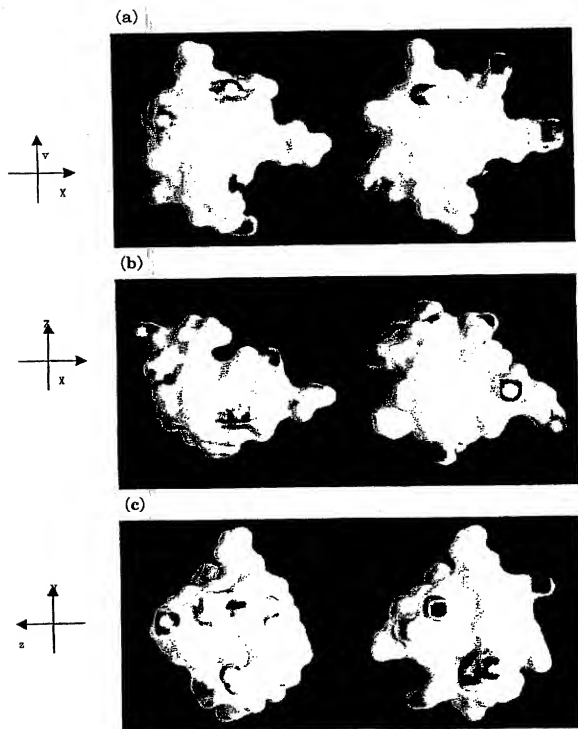
【図4】



【図5】

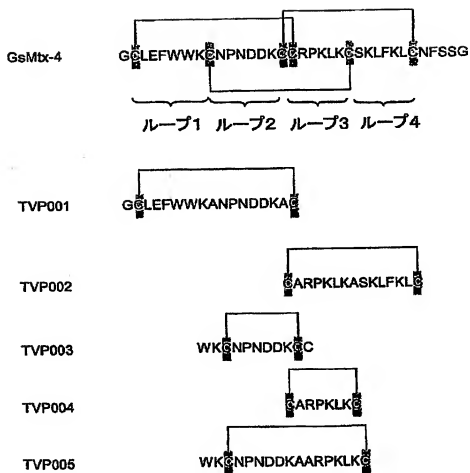


【図6】

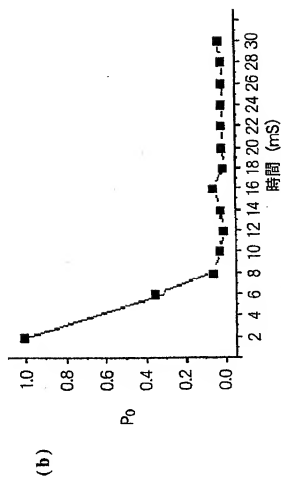
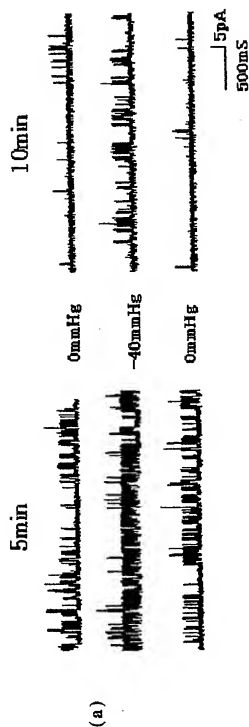




【図 7】

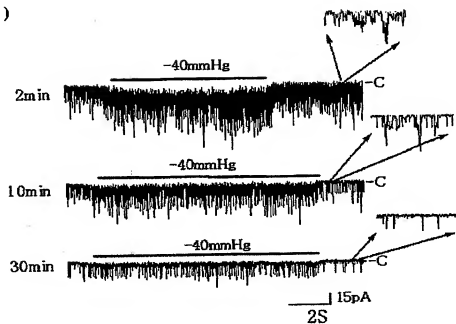


【図 8】

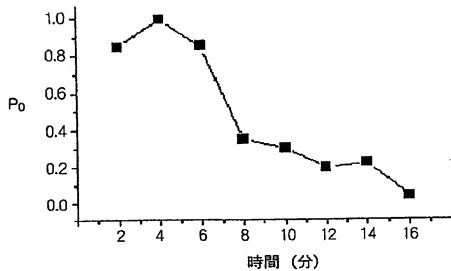


【図 9】

(a)

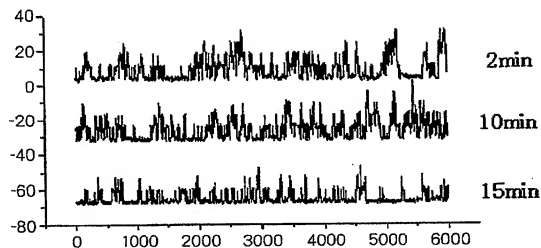


(b)

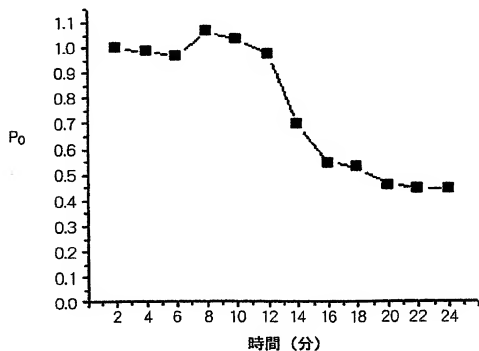


【図10】

(a)



(b)



【書類名】 要約書

【課題】 機械刺激感受性チャネルの活性を特異的に阻害する新規ポリペプチド、このようなポリペプチド、またはその塩を含有する機械刺激感受性チャネル阻害剤、心房細動の治療薬を提供する。

【解決手段】 配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩や、これらを含有する機械刺激感受性チャネル阻害剤、心房細動の治療薬など。

【選択図】 図7

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 P03-0030
【提出日】 平成15年 4月 2日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003- 85666
【補正をする者】
【識別番号】 500386563
【氏名又は名称】 株式会社ファルマデザイン
【代理人】
【識別番号】 100092783
【弁理士】
【氏名又は名称】 小林 浩
【電話番号】 03-3273-2611

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区八丁堀 4-2-10 第二後関ビル 株式会社ファルマデザイン内

【氏名】 横田川 高峰

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65 名古屋大学大学院医学系研究科 細胞生物物理学教室内

【氏名】 曾我部 正博

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区八丁堀 4-2-10 第二後関ビル 株式会社ファルマデザイン内

【氏名】 古谷 利夫

【その他】 出願の際、発明者の記載に誤記がありましたので訂正致します。

【ブルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-085666
受付番号	50300549133
書類名	手続補正書
担当官	関 浩次 7475
作成日	平成15年 4月14日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】

500386563

【住所又は居所】

東京都中央区八丁堀4-2-10 第二後関ビル
3F

【氏名又は名称】

株式会社ファルマデザイン

【代理人】

申請人

【識別番号】

100092783

【住所又は居所】

東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9
階 阿部・井窪・片山法律事務所

【氏名又は名称】

小林 浩

次頁無

特願2003-085666

出願人履歴情報

識別番号

[500386563]

1. 変更年月日

2000年 8月15日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区八丁堀4-2-10 第二後関ビル3F

氏 名

株式会社ファルマデザイン

2. 変更年月日

2003年 4月23日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区八丁堀2丁目19番8号 長谷工八丁堀ビル5階

氏 名

株式会社ファルマデザイン